

学校编码: 10384 分类号: 密级:
学 号: B20051403188 UDC:

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

好氧不产氧光合异养菌碳源和光能利用及
东海自然细菌群落碳源利用的研究

Experimental Studies On Carbon source utilization of Aerobic
Anoxygenic Phototrophic Bacteria (AAPB) and metabolic
diversity of bacterial community in the East China Sea

李强

指导教师姓名: 焦念志 教授

专 业 名 称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2009 年 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 年 月 日

导师签名:

日期: 年 月 日

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT	IV
第1章 文献综述	1
1.1 异养细菌对海洋碳循环的意义研究	1
1.1.1 异养细菌对于海洋碳循环的贡献.....	1
1.1.2 海洋异样细菌中的特殊光能利用类群.....	2
1.2 海洋细菌功能类群（AAPB）研究现状.....	4
1.2.1 AAPB 在全球海洋中的生态分布研究.....	4
1.2.2 AAPB 的系统发育分类学.....	6
1.2.3 AAPB 细胞学特点.....	7
1.2.4 AAPB 生理特点以及适应性机制的研究.....	11
1.3 细菌群落碳源利用的研究.....	17
1.3.1 Biolog 方法介绍.....	18
1.3.2 应用 Biolog 方法检测生态群落功能多样性的优缺点.....	20
1.3.3 Biolog 方法的数据处理.....	23
1.4 本论文的设计与研究意义.....	25
第 2 章 AAPB 碳源的利用特点以及光照对于碳源利用的影响.....	27
2.1 摘要.....	27
2.2 研究背景.....	28
2.2.1 <i>Erythrobacter</i> 的特点介绍.....	28
2.2.2 <i>Roseobacter</i> 特点以及在海洋中的分布.....	30
2.3 材料与方法.....	31
2.3.1 实验仪器与试剂.....	31
2.3.2 实验方法.....	31
2.4 实验结果.....	35

2.4.1 AAPB 和 nonAAPB 碳源利用差异对比.....	35
2.4.2 光照利用对于 AAPB 碳源利用的影响.....	44
2.5 实验结果讨论.....	47
2.5.1 AAPB 和普通异养细菌的碳源利用结果对比.....	47
2.5.2 光照对于 AAPB 碳源利用的影响.....	49
2.6 实验小结.....	50
第 3 章 好氧 AAPB 生物标记物的研究.....	52
3.1 摘要.....	52
3.2 研究背景.....	53
3.3 材料和方法.....	54
3.3.1 实验菌株.....	54
3.3.2 实验方法.....	55
3.4 结果与讨论.....	55
3.5 实验小结.....	59
第 4 章 东海细菌群落碳源利用研究.....	60
4.1 摘要.....	60
4.2 研究背景.....	61
4.3 材料和方法.....	62
4.3.1 实验仪器和材料.....	62
4.3.2 实验方法.....	62
4.4 实验结果.....	65
4.4.1 采样站位及其环境条件	65
4.4.2 东海表层细菌群落碳源利用特点.....	66
4.4.3 垂直断面细菌群落的碳源利用结果.....	70
4.5 实验结果讨论.....	72
4.6 实验小结.....	76
第 5 章 本论文的主要结论和创新点.....	77
参考文献.....	79

攻读博士学位期间发表和已投稿的论文.....	91
致谢.....	92

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Abstract(Chinese).....	I
Abstract.....	IV
Chapter 1. Literature Review	1
1.1 Study of marine heterotrophic bacteria in carbon cycle.....	1
1.1.1 Contribution of heterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean..	1
1.1.2 Marine functional bacterial groups with the capability of phototrophy.....	2
1.2 Progreses in studies on AAPB	4
1.2.1 Distribution of AAPB in the ocean.....	4
1.2.2 Taxonomy、 phylogeny features of AAPB.....	6
1.2.3 Morphology of AAPB.....	7
1.2.4 Physiological characteristics and adaptation mechanisms of AAPB.....	11
1.3 Carbon source utilization on bacteria community.....	17
1.3.1 Introduction of Biolog method.....	18
1.3.2 The advantages and disadvantages of Biolog method.....	20
1.3.3 Data analysis of Biolog method.....	23
1.4 Design of this thesis and research significance.....	25
Chapter 2. AAPB carbon source utilization capability and its affecting factors.....	27
2.1 Abstract.....	27
2.2 Research background.....	28
2.2.1 Ecological characteristics of Erythrobacter genus	28
2.2.2 Ecological characteristics and distrubuton of Roseobacter clade	30
2.3 Material and methods.....	31

2.3.1 Instruments and reagents.....	31
2.3.2 Methods.....	31
2.4 Results.....	35
2.4.1 The difference in carbon source utilization between AAPB and On AAPB.....	35
2.4.2 Influence of illumination on carbon source utilization by AAPB.....	44
2.5 Discussion.....	47
2.5.1 Comparison of AAPB and nonAAPB in carbon source utilization.....	47
2.5.2 Effects of light on Carbon source utilization in AAPB	49
2.6 Summary.....	50
Chapter 3 Study of AAPB biomarker.....	52
3.1 Abstract.....	52
3.2 Research background.....	53
3.3 Material and methods.....	54
3.3.1 Tested strains.....	54
3.3.2 Methods.....	55
3.4 Result and discussion.....	55
3.5 Summary.....	59
Chapter 4 Study of carbon source utilization of bacteria community in the East China Sea.....	60
4.1 Abstract.....	60
4.2 Research background.....	61
4.3 Material and methods.....	62
4.3.1 Instrument and reagents.....	62
4.3.2 Methods.....	62
4.4 Results.....	65
4.4.1 Decription of sampling stations.....	65
4.4.2 Bacterial carbon source utilization capacity in the surface of the East China Sea.....	66

4.4.3 Bacterial carbon source utilization at different depth.....	70
4.5 Discussion.....	72
4.6 Summary.....	76
Chapter 5 Conclusion remarks.....	77
Reference.....	79
List of publications.....	91
Acknowledgement.....	92

摘要

好氧不产氧光合细菌 (AAPB) 是一类可以利用光能的异养细菌, 生态调查研究表明这一功能类群在海洋中广泛分布且在一些海区占有重要份额, 独特的光能利用能力使其在海洋碳循环过程中充当着重要角色。而且, 作为从厌氧光合细菌到异养细菌进化过程中的过渡类群, 这个类群的研究对于我们认识光合细菌的进化历史具有非常重要的意义。

为深入研究 AAPB 的生理适应性机制, 我们把 AAPB 菌株和同属的异养细菌进行了对比。首先从形态上对比, 电镜超薄切片的实验结果表明, 尽管 AAPB 可以利用光能, 但细胞内并没有发现与红螺菌类似的清晰的膜片层结构, 从细胞学结构上来看, AAPB 更类似于异养细菌。其次从生理代谢的角度对比, AAPB 和对照菌株的碳源利用谱图表明, 不同种属来源的 AAPB 碳源利用特征有很大差异, 说明这个功能类群具有代谢多样性的特点; 而同属来源 (例如 *Erythrobacter* 属) 的 AAPB 和普通异养细菌相比, AAPB 的碳源利用能力则明显要弱。通过 Biolog GN 板上 95 种碳源进行的碳源偏好性分析表明, 相对于普通异养细菌, AAPB 在 95 种碳源中更偏好一些比较简单的有机碳源 (乙醇和丙二醇)。

可以利用光能是 AAPB 类群最重要的特点, 但我们并不清楚光能利用代谢功能会对 AAPB 的碳源吸收利用产生何种程度的影响? 为解决这个问题, 我们对比了 4 株不同的 AAPB 菌株在光照条件下的碳源利用变化。结果说明, 在同样的培养条件下 AAPB 菌株对于光照刺激的响应具有明显的差异, 菌株 DMS6997 在光照条件下表现为光刺激碳源的吸收利用, 而其他 3 株 AAPB 菌株在光照条件下表现为光照会抑制碳源的吸收利用。这说明尽管所有 AAPB 菌株都具有细菌叶绿素, 可以利用光能, 但是由于 AAPB 菌株本身的碳源代谢差异, 某一特定的环境条件可能只适合某一类或某一种 AAPB 充分发挥光能利用的优势。

除了对于不同功能类群的菌株进行碳源利用研究外, 本论文还对东海细菌群落碳源利用多样性进行了研究。研究结果表明, 东海表层海水碳源利用以糖类、有机酸以及多聚物为主, 氨基酸类碳源利用比较少。而不同站位的细菌群落碳源利用差异最大的是多聚物类碳源, 相关性分析结果表明, 多聚物类碳源的利用与环境的温度有很好的相关性, 表明温度是影响细菌群落碳源利用的重要环境因子。而对不同垂直水层的细菌群落碳源利用的研究表明, 相对于真光层细菌群落,

深海细菌群落对于碳源具有更高的响应速度。

关键词： 好氧不产氧光合细菌（AAPB） Biolog 碳源利用 功能多样性

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Aerobic Anoxygenic Photoheterotrophic Bacteria (AAPB) are a group of heterotrophic bacteria with the capability of phototrophy. Previous studies have showed that they ubiquitously exist in the global oceans and play a key role in the marine carbon cycle. Furthermore, as a possible transition species in evolution linking from purple photosynthetic bacteria to aerobic heterotrophic bacteria, AAPB are a good model species to explore early evolution of photosynthesis.

With the objective of understanding the physiological characteristics mechanisms of AAPB, the typical AAPB strains and heterotrophic bacterial strains from the same taxonomical genera were employed to the comparative experiments in the present study. The electronic microscopic observations showed that despite AAPB having the ability of light utilization, there are no distinct differences between the AAPB and heterotrophic bacterial strains in terms of morphological features and no photosynthetic apparatus present in the AAPB cells. The experiments of carbon sources utilization showed that significantly different characters of carbon utilization were observed between different taxonomic AAPB strains, indicating the diverse metabolisms in this functional group. Furthermore, the Biolog assay showed that AAPB strains exhibited a lower capability of carbon-source utilization than their phylogenetic relatives and the preferences in utilization of acetate and butanediol.

Light is one of the most important environmental factors for AAPB, but little is known about the effect of illumination on the carbon source utilization. In present study, we carried out time-series Biolog assay of the four AAPB strains involved in the culture experiments under illumination/dark. The results showed distinct responses among AAPB strains when illumination was switched on after a period of dark culture. Strain DMS6997 exhibited the light-stimulated enhancement of biomass while other strains showed the reverse response, suggesting that even all AAPB strains have the ability of light utilization, only part of them could take the advantage of light utilization under some specific environments.

Additionally, Biolog-GN MicroplatesTM were also applied in the natural samples

in the East China Sea sampled in Jan 2007 to understand the spatial variation in the metabolic diversity of microbial community. Biolog-GN plates were incubated for 7 days, during which color development was monitored twice daily by optical density (OD590) measurements. The time-series carbon-source utilization profiles indicated that carbohydrates and organic acids were the main carbon source utilized by microbial communities in the surface water of the ECS while amino acids were rarely used. Along the horizontal gradient, polymer was the more frequently used substrate at the open ocean stations than the coastal stations. Furthermore, the correlation analysis showed that utilization of polymer was significantly affected by temperature. Along vertical gradient, the response of bacterial community from the deep water to carbon sources was faster than from the euphotic zone.

KEY WORDS: Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria (AAPB); BIOLOG; Carbon source utilization; Function diversity

第1章 前言

1.1 异养细菌对于海洋碳循环的意义

自从1977年, Hobbie 等人第一次用表面荧光显微镜观察到海洋细菌的存在, 海洋细菌在海洋生物群落中的重要性逐渐被海洋生物学家发现并认知, 这一微小的生物类群不仅仅是全球海洋生物量的主要贡献者, 同时在海洋物质和能量循环中发挥着无可取代的作用。

1.1.1 异养细菌对于海洋碳循环的贡献

Pomeroy 首先认识到海洋微生物在海洋物质和能量循环中的重要作用, 认为这些微生物是海洋食物环中能流和物流循环的推动力(Pomeroy, 1974), 1983 年 Azam 等对这一观点进一步完善, 提出了微型生物食物环 (Microbial Loop) 的概念, 在微食物环中, 海洋细菌同时扮演分解者和二次生产者的角色, 一方面, 作为分解者分解水体中大量存在的有机物质, 同时释放营养盐; 另一方面, 它能够吸收溶解有机物 (Dissolved Organic Material, DOM), 这部分物质是浮游植物通过光合作用固定产生的, 但是浮游动物所不能捕食和直接利用, 必须首先通过异养细菌的吸收利用, 将之转化成为颗粒有机物 (Particulate Organic Material, POM), 即细菌自身的生物量, 然后继续沿食物链向上传递, 从而提高了海洋生态系统的总生态效率, 异养细菌利用 DOM 转变为 POM 这一过程叫做细菌的次级生产, 通常异养细菌的次级生产力相当于初级生产力的 20~30 % (Cole et al., 1988), 起着举足轻重的作用, 另外, 从生物量上来看, 原核生物 (细菌和古菌) 在海洋水体中约有 12×10^{28} (Whitman et al., 1998) 的数量, 在整个海洋系统真光层中总细菌碳量为 $0.5 \sim 2 \text{ gC/m}^2$ (Kirchman, 2000), 异养细菌的生物量占总颗粒有机碳的 14~62 % (Azam et al., 1992)。在丰度, 生物量, 甚至代谢活性以及基因和生化组分多样性等方面均远远超过了多细胞生物, 充分说明在海洋生态系统中异养细菌的重要作用。

在海洋碳循环中, 异养细菌吸收海洋中的有机碳, 除一部分用于细胞呼吸通过 CO_2 的形式释放到大气中, 另外的一部分转化为自身的生物量, 然后通过微食物环把这部分碳重新参与到全球的碳循环中, 在这个过程中, 异养微生物对有

机碳的转化效率取决于细胞的呼吸消耗(通过氧化有机碳生成二氧化碳为有机体提供能量的过程)和生物的合成(形成新的细胞物质的过程)之间的比例,一般认为异养细菌吸收的有机碳大约 30%形成生物量,而 70%则被细胞呼吸消耗(Moran et al., 2007),以 CO_2 的形式重新返回到大气中,在不同海区,这个比例有所不同,而这个比例非常重要,直接会影响到海洋中 CO_2 的源和汇的问题,即当海洋通过呼吸作用向大气中释放的二氧化碳多于初级生产固定的二氧化碳,海洋是 CO_2 的源,在相反的情况下海洋作为汇。所以,而异养细菌的这种转化效率直接关系到海洋的碳收支平衡,进一步又对全球的碳循环产生影响。

1.1.2 海洋异养细菌中的特殊光能利用类群

近几年来,随着对于海洋微生物研究的深入,特别是分子生物学技术以及分离培养技术的进展,具有不同功能特点的细菌类群陆续被发现或分离出来,先前人们认为海洋细菌以海水中的有机碳作为他们全部的能量来源,而最新的研究发现表明,在海洋中,一些异养细菌中存在一些比较特殊获取能量的方式,有机碳源并不是细菌唯一获取能量的方式,部分海洋细菌可以通过一些比较特殊的途径来获取能量,如对于 CO 的利用,以及一些可以直接利用光能转换为能量的细菌,如好氧不产氧光合细菌(Aerobic Anoxigenic Phototrophic Bacteria, AAPB)和视紫质细菌(Proteorhodopsin, PR),这些细菌的特殊利用能量的方式,改变了人们以前对于海洋异养细菌的认知,同时影响异养细菌从 DOC 到 POC 的转化效率(如利用直接利用光能,减少 DOC 的消耗),而生态的调查研究进一步表明,这些具有特殊功能的细菌在海洋中广泛存在且占有较大份额,对于这类细菌的研究,可以进一步修正完善我们对于海洋碳循环的认识。

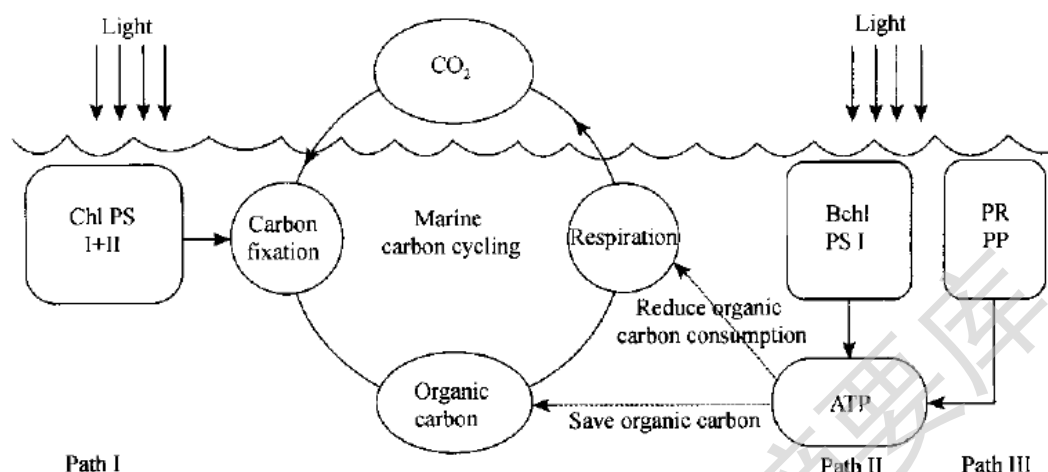


图 1-1.海洋上层光能利用生物与碳循环模型 (Jiao et al., 2006)

Fig.1-2. A model of light bio-utilization and carbon cycling in the sea. Chl, Chlorophyll; BChl, bacteriochlorophyll; PR, proteorhodopsin; PS I and II, photosystem I and II; pp, proton pump (Jiao et al., 2006) .

好氧不产氧光合细菌是在 1978 年 Shiba 在日本近海发现, 然而, 直到 2001 年的对于太平洋的生态调查发现: 这一功能类群在大洋中占据重要比例 (Kolber et al., 2001), 而且广泛分布在不同海洋环境中的真光层中。和严格意义上的异养细菌不同, 这一功能类群在利用有机物质进行异养生长的同时, 可以利用细菌叶绿素进行辅助的光合作用, 把光能直接转化为 ATP, 供细胞利用, 从而减少对于有机碳的依赖和消耗 (图 1-1)。和 AAPB 不同, 视紫质细菌的光能利用是直接通过 PR 蛋白实现的, 2000 年 Béjà 等通过基因组技术首次在一段属于 γ -proteobacteria 类群的基因组片断中发现了 PR 蛋白的编码基因, 并在 *E. coli* 中得到表达, 证实其功能是利用光能将质子泵出细胞膜外, 这种质子泵产生的跨膜电势导致 ATP 的合成。已有研究表明 PR 细菌是地球上最丰富的生物之一, 表层海水中 PR 细菌约占总细菌数量的 13 %, 而每个细胞中 PR 的平均分子数约为 2.5×10^4 个 (Sabehi et al., 2005)。

对于这两类光能利用细菌的研究和认识, 一方面可以修正了我们对于海洋碳循环的认识 (图 1-1), 另一方面, 这些功能类群是如何利用光能的? 利用效率如何? 以及进化来源如何? 这些问题的研究和解答将对于我们深入认识海洋微

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库